

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22420081151501

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

拟穴青蟹神经细胞培养及钠、钾、钙离子通道的分子克隆与表达

Neuron culture, molecular cloning and expression of sodium, potassium and calcium ion channels in the mud crab, *Scylla paramamosain*

徐 艳

指导教师姓名: 叶海辉 副教授

专 业 名 称: 海 洋 生 物

论文提交日期: 2011 年 6 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

2011年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘要.....	XI
Abstract	XIV
第 1 章 绪 论	1
1.1 海洋无脊椎动物细胞培养	1
1.1.1 海洋无脊椎动物细胞培养简介	1
1.1.2 甲壳动物细胞培养简介.....	1
1.2 离子通道	2
1.2.1 离子通道概述	2
1.2.2 离子通道分类	2
1.2.3 离子通道的命名	2
1.2.4 离子通道的作用	3
1.2.5 离子通道的特性	3
1.2.6 电压门控 Na ⁺ 通道研究进展	4
1.2.7 钙激活 K ⁺ 通道研究进展.....	6
1.2.8 电压门控 Ca ²⁺ 通道研究进展	8
1.3 研究的目的是和意义	10
1.3.1 拟穴青蟹脑神经节神经细胞培养	10
1.3.2 拟穴青蟹离子通道基因研究及免疫组织化学定位	11
第 2 章 拟穴青蟹脑神经节神经细胞培养.....	12
2.1 材料和方法	12
2.1.1 材料	12
2.1.2 实验方法	14
2.2 结果	15
2.2.1 不同的酶解方法的效果	15
2.2.2 不同培养基的效果	15
2.2.3 不同的添加物的作用	16
2.2.4 神经细胞体外生长状况	16

2.3 讨论	25
第 3 章 拟穴青蟹电压门控 Na^+ 通道分子克隆、组织表达以及免疫组	
织化学研究	28
3.1 材料和仪器	28
3.1.1 材料	28
3.1.2 主要仪器	30
3.2 分子克隆方法	30
3.2.1 胸神经团总 RNA 的提取	30
3.2.2 电压门控 Na^+ 通道(VGSC)片段的克隆	31
3.3 VGSC 半定量 RT-PCR	35
3.3.1 各组织器官总 RNA 的提取	35
3.3.2 cDNA 第一链的合成	35
3.3.3 PCR 反应	35
3.4 生物信息学软件分析	35
3.5 免疫组织化学定位	36
3.5.1 取材与制片	36
3.5.2 主要试剂	36
3.5.3 免疫组织化学程序	36
3.5.4 对照实验与结果观察	37
3.6 结果	37
3.6.1 胸神经团总 RNA 的提取	37
3.6.2 VGSC 基因片段的获得	38
3.6.3 VGSC 基因部分 cDNA 序列分析	39
3.6.4 VGSC 部分序列所编码的氨基酸序列分析	41
3.6.5 VGSC 序列同源性分析	42
3.6.6 VGSC 基因的组织表达	43
3.6.7 VGSC 免疫组织化学定位	44
3.7 讨论	46
3.7.1 VGSC 部分 cDNA 序列分析	46

3.7.2 VGSC 组织表达和免疫组织化学分析.....	47
第 4 章 拟穴青蟹钙激活 K^+ 通道分子克隆、组织表达以及免疫化学研 究.....	48
4.1 材料和仪器	48
4.1.1 材料	48
4.1.2 主要仪器	49
4.2 分子克隆方法	49
4.2.1 胸神经团总 RNA 的提取.....	49
4.2.2 钙激活 K^+ 通道(CAPC)片段的克隆.....	49
4.3 CAPC 半定量 RT-PCR 研究.....	50
4.3.1 拟穴青蟹各组织器官总 RNA 的提取.....	51
4.3.2 cDNA 第一链的合成.....	51
4.3.3 PCR 反应.....	51
4.4 生物信息学软件分析	51
4.5 免疫组织化学定位	51
4.5.1 取材与制片	51
4.5.2 主要试剂	51
4.5.3 免疫组织化学程序	52
4.5.4 对照实验与结果观察	52
4.6 结果	52
4.6.1 肌肉总 RNA 的提取.....	52
4.6.2 CAPC 基因片段的获得.....	52
4.6.3 CAPC 基因部分 cDNA 序列分析.....	54
4.6.4 CAPC 部分序列所编码的氨基酸序列分析.....	55
4.6.5 CAPC 序列同源性分析	57
4.6.6 CAPC 基因的组织表达	58
4.6.7 CAPC 免疫组织化学定位.....	59
4.7 讨论	62
4.7.1 CAPC 部分 cDNA 序列分析.....	62

4.7.2 CAPC 组织表达和免疫组织化学分析	63
第 5 章 拟穴青蟹电压门控 Ca^{2+} 通道分子克隆、组织表达以及免疫组 织化学研究	65
5.1 材料和仪器	65
5.1.1 材料	65
5.1.2 主要仪器	65
5.2 分子克隆方法	66
5.2.1 胸神经团总 RNA 的提取	66
5.2.2 VGCC 3'非编码区的克隆	66
5.3 VGCC 半定量 RT-PCR 研究	68
5.3.1 各组织器官总 RNA 的提取	68
5.3.2 cDNA 第一链的合成	68
5.3.3 PCR 反应	68
5.4 生物信息学软件分析	69
5.5 免疫组织化学定位	69
5.5.1 取材与制片	69
5.5.2 主要试剂	69
5.5.3 免疫组织化学程序	69
5.5.4 对照实验与结果观察	69
5.6 结果	69
5.6.1 胸神经团总 RNA 的提取	69
5.6.2 VGCC 基因 3'端的获得	69
5.6.3 VGCC 基因部分 cDNA 序列分析	70
5.6.4 VGCC 部分序列所编码的氨基酸序列分析	71
5.6.5 VGCC 序列同源性分析	73
5.6.6 VGCC 基因的组织表达	74
5.6.7 VGCC 免疫组织化学定位	74
5.7 讨论	75
5.7.1 VGCC 部分 cDNA 序列分析	75

5.7.2 VGCC 组织表达分析和免疫组织化学分析	76
结语	77
参考文献	79
在学期间所参与科研项目与所获成果	86
致谢	88

Contents

Abstract in Chinese.....	XI
Abstract in English.....	XIV
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Cell culture of marine invertebrate.....	1
1.1.1 Review on cell culture of marine invertebrate.....	1
1.1.2 Review on cell culture of crustacean.....	1
1.2 Ion channel.....	2
1.2.1 Review on ion channel.....	2
1.2.2 Categories of ion channel.....	2
1.2.3 Naming of ion channel.....	2
1.2.4 Effect of ion channel.....	3
1.2.5 The property of ion channel.....	3
1.2.6 The research progress of voltage gated Na ⁺ channel.....	4
1.2.7 The research progress of calcium activated K ⁺ channel.....	6
1.2.8 The research progress of voltage gated Ca ²⁺ channel.....	8
1.3 The objects and significance of the research.....	10
1.3.1 Neuron culture of cerebral ganglion from <i>Scylla paramamosain</i>	10
1.3.2 Research of ion channels and immunohistochemical study of <i>Scylla paramamosain</i>	11
Chapter 2 Neuron culture of cerebral ganglion from <i>Scylla paramamosain</i>	10
2.1 Materials and methods.....	11
2.1.1 Materials.....	12
2.1.2 Experimental methods	12
2.2 Results.....	14
2.2.1 The effects of different enzymolysis.....	15
2.2.2 The effects of different media.....	15

2.2.3 The effects of different supplyments.....	15
2.2.4 The out growth of neurons in vitro.....	16
2.3 Discussion.....	16
Chapter 3 Molecular cloning, expression and immunohistochemical study	
of voltage gated Na ⁺ channels VGCC of <i>Scylla paramamosain</i>	25
3.1 Materials and apparatus.....	28
3.1.1 Materials.....	28
3.1.2 Main apparatus.....	28
3.2 Molecular cloning method.....	30
3.2.1 Extraction of total RNA from thoracic ganglia mass.....	30
3.2.2 Cloning of partial VGSC.....	30
3.3 Semi Quantitative of VGSC.....	31
3.3.1 Extraction of total RNA of some organ tissues.....	35
3.3.2 First strand synthesis of cDNA.....	35
3.3.3 PCR reacting.....	35
3.4 Analysis the data using bioinformatics softs.....	35
3.5 Immunoreaction of VGSC in organ tissues.....	35
3.5.1 Tissue preparations.....	36
3.5.2 Main reagents.....	36
3.5.3 Max vision TM immunohistochemical process.....	36
3.5.4 Control group and results observations.....	36
3.6 Results.....	37
3.6.1 Extraction of total RNA of some organ tissues.....	37
3.6.2 Acquisition of partial cDNA of VGSC.....	37
3.6.3 Analysis of partial cDNA of VGSC.....	38
3.6.4 The amino acid sequences encoded by the partial cDNA of VGSC.....	39
3.6.5 Sequence homology analysis of VGSC.....	41
3.6.6 Expression of VGSC.....	42
3.6.7 The immunoreaction of VGSC.....	43

3.7 Discussion.....	44
3.7.1 Analysis of partial cDNA of VGSC.....	46
3.7.2 Expression and immunoreaction of VGSC in organ tissues.....	46
Chapter 4 Molecular cloning, expression and immunohistochemical study of calcium activated K ⁺ channels CAPC of <i>Scylla paramamosain</i>	47
4.1 Materials and apparatus.....	48
4.1.1 Materials.....	48
4.1.2 Main apparatus.....	48
4.2 Molecular cloning method.....	49
4.2.1 Extraction of total RNA from thoracica ganglia mass.....	49
4.2.2 Cloning of partial CAPC.....	49
4.3 Semi Quantitative of CAPC.....	50
4.3.1 Extraction of total RNA of some organ tissues	51
4.3.2 First strand synthesis of cDNA.....	51
4.3.3 PCR reacting.....	51
4.4 Analysis the data using bioinformatics softs.....	51
4.5 Immunoreaction of CAPC in organ tissues.....	51
4.5.1 Tissue preparations.....	51
4.5.2 Main reagents.....	51
4.5.3 Max vision TM immunohistochemical process.....	52
4.5.4 Control group and results observations.....	52
4.6 Results.....	52
4.6.1 Extraction of total RNA of some organ tissues.....	52
4.6.2 Acquisition of partial cDNA of CAPC.....	52
4.6.3 Analysis of partial cDNA of CAPC.....	54
4.6.4 The amino acid sequences encoded by the partial cDNA of CAPC.....	55
4.6.5 Sequence homology analysis of CAPC.....	57
4.6.6 Expression of CAPC.....	58
4.6.7 The immunoreaction of CAPC.....	59

4.7 Discussion.....	62
4.7.1 Analysis of partial cDNA of CAPC.....	62
4.7.2 Expression and immunoreaction of CAPC in organ tissues.....	63
Chapter 5 Molecular cloning, expression and immunohistochemical study of voltage gated Ca^{2+} channels VGCC of <i>Scylla paramamosain</i>	65
5.1 Materials and apparatus.....	65
5.1.1 Materials.....	65
5.1.2 Main apparatus.....	65
5.2 Molecular cloning method.....	66
5.2.1 Extraction of total RNA from thoracic ganglia mass.....	66
5.2.2 Cloning of partial VGCC.....	66
5.3 Semi Quantitative of VGCC.....	68
5.3.1 Extraction of total RNA of some organ tissues.....	68
5.3.2 First strand synthesis of cDNA.....	68
5.3.3 PCR reacting.....	68
5.4 Analysis of the data using bioinformatics softs.....	69
5.5 Immunoreaction of VGCC in organ tissues.....	69
5.5.1 Tissue preparations.....	69
5.5.2 Main reagents.....	69
5.5.3 Max vision TM immunohistochemical process.....	69
5.5.4 Control group and results observations.....	69
5.6 Results.....	69
5.6.1 Extraction of total RNA of some organ tissues.....	69
5.6.2 Acquisition of partial cDNA of VGCC.....	70
5.6.3 Analysis of partial cDNA of VGCC.....	71
5.6.4 The amino acid sequences encoded by the partial cDNA of VGCC.....	73
5.6.5 Sequence homology analysis of VGCC.....	74
5.6.6 Expression of VGCC.....	74
5.6.7 The immunoreaction of VGCC.....	75

5.7 Discussion.....	75
5.7.1 Analysis of partial cDNA of VGCC.....	75
5.7.2 Expression and immunoreaction of VGCC in organ tissues.....	76
Conclusions.....	77
Reference.....	79
Research projects and achievements.....	86
Acknowledgements.....	88

摘 要

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*), 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*), 是中国大陆东南沿海 4 种青蟹中分布最广, 数量最多的类群^[1]。拟穴青蟹抗逆性强, 肉味鲜美, 营养价值高, 具有重要的经济价值, 是我国目前养殖产量最高的海洋蟹类。

本研究在体外培养了拟穴青蟹脑神经节的神经细胞, 结果如下: 神经细胞在 modified Medium 199 (M199)培养基中比在 Liebowitz's Medium (L-15)培养基中更能保持良好的细胞形态和生长。胎牛血清(FBS)、青蟹肌肉提取液以及青蟹血淋巴提取液作为添加剂加入培养基中, 结果发现 20%的 FBS 能够明显促进神经细胞的体外生长。采用胶原蛋白酶 I 型与胰蛋白酶分别作为酶解液分离脑神经节的神经细胞, 发现两者酶解效果相似。在体外培养中共发现了 7 种不同形态特征的神经细胞, 分别为: “small cells”, “veilers”, “branchers”, “multipolar cells”, “super-large cells”, “unipolar cells” 和 “bipolar cells”。这些细胞在体外能够生存 1 周多时间。在这 7 种细胞中, “bipolar cells” 首次在甲壳动物的神经细胞培养中被发现, 而且相对其他 6 种细胞, 其在体外的生存时间更长。

利用 RT-PCR 分子生物学技术, 扩增了拟穴青蟹电压门控钠离子通道(VGSC)、钙激活钾离子通道(CAPC)和电压门控钙离子通道(VGCC)的部分 cDNA 序列, 推导出其各自的部分氨基酸序列。得到拟穴青蟹 VGSC 部分 cDNA, 共 2282 bp, 包括 1 个 Na⁺通道和其亚基共有的超家族结构域(长度为 263 个氨基酸)、7 个跨膜区域和 3 个富含 GC 和 AT 区。得到拟穴青蟹 CAPC 部分 cDNA 共 2235 bp 个核苷酸, 克隆出的部分片段包括大容量钙激活 K⁺通道 α 亚基特征结构域, 从核苷酸所编码的第 217 个氨基酸到第 316 个氨基酸位点(共 99 个)、2 个跨膜区域和 5 个富含 GC 和 AT 区。得到拟穴青蟹 VGCC 部分 cDNA 共 1310 bp, 其中包括 3'端非编码区 185 bp 的核苷酸。克隆出的部分片段包括鸟苷酸激酶的特征结构域, 从核苷酸所编码的第 42 个氨基酸到第 224 个氨基酸位点(共 182 个氨基酸)和 1 个富含 GC 和 AT 区。

运用半定量 RT-PCR 技术, 分别检测了发育早期雌蟹的 8 个组织器官(包括肌肉、肝胰腺、心脏、视神经节、脑、胃、胸神经团和卵巢)中 VGSC、CAPC

和 VGCC 的 mRNA 转录表达情况。VGSC 表达结果为：胸神经团、胃与卵巢表达较高，而在其余组织中几乎检测不到表达。CAPC 表达结果为：在胸神经团、胃、心脏、视神经节和卵巢中表达较高，而在其余组织中几乎检测不到表达。VGCC 表达结果为：在胸神经团、胃和卵巢中表达较高，而在其余组织中几乎检测不到表达。此结果显示 VGSC、CAPC 和 VGCC 的分布均呈现出组织特异性。

采用购买自 Abcam 公司的 VGSC 和 VGCC 抗体，和购买自 Sigma 公司的 CAPC 抗体应用高灵敏性的 SABC 免疫组织化学方法，对拟穴青蟹的部分组织器官进行了定位。结果显示：VGSC 免疫阳性物质在胸神经团中主要位于神经细胞的细胞膜和神经轴突上，且呈极性分布；在卵巢中也定位于细胞膜上。CAPC 免疫阳性物质在胸神经团、卵巢、视神经节和肝胰腺均有分布。其中在胸神经团中主要存在于神经细胞的细胞膜和神经轴突上，且呈极性分布；在其他器官的细胞中定位于细胞膜上。VGCC 免疫阳性物质存在于胸神经团、视神经节和肝胰腺中，其中在胸神经团中主要存在于神经细胞的细胞膜和神经轴突上，且呈极性分布；在其他器官的细胞也定位于细胞膜上。

关键词：拟穴青蟹；神经细胞；细胞培养；离子通道；分子克隆；基因表达；免疫组织

Abstract

The mud crab, *Scylla paramamosain*, which belongs to Arthropoda, Crustacea, Decapoda, Portunidae, is the most widely distributed and is most numerous compared to other species of the groups of the four mud crab in the southeast coast of mainland China. It has strong adversity resistance. It is delicious and is of great commercial value.

Crustacean neurons, obtained from the cerebral ganglion of the mud crab *S. paramamosain*, were successfully cultured in vitro. The results as followed: they maintained typical morphological characteristics and showed better outgrowth in modified Medium 199 (M199) medium than that in Liebowitz's L-15 medium. Fetal bovine serum (FBS), muscle extracts, and hemolymph of the mud crab *S. paramamosain* were added as supplements. Only 20% FBS could promote neuron outgrowth, while muscle extracts and hemolymph of *S. paramamosain* did not improve neuron outgrowth. For cell dissociation, both collagenase type I and trypsin worked well as determined by initial cell viability and following cell outgrowth potential. More than six kinds of cells with different morphological characteristics were identified in the neuron outgrowth. They were "small cells", "veilers", "branchers", "multipolar cells", "super-large cell", "unipolar cells" and "bipolar cells". Among all of the cells, "bipolar cells" were identified for the first time in crustacean neurons culture and they could live longer than other cells. The neurons could grow for more than a week before retraction and eventual degradation.

The *S. paramamosain* VGSC, CAPC and VGCC partial cDNA sequences were cloned using reverse transcriptase PCR method. The VGSC partial cDNA was 2282 bp, encoded partial polypeptides including a particular region of Na-trans₂assoc superfamily, seven trans-membrane region and one low complexity region. The CAPC partial cDNA was 2235 bp, encoded partial polypeptides including a particular region of calcium-activated BK potassium channel α -subunit, two trans-membrane regions and five low complexity regions. The VGCC partial cDNA was 1310 bp,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库